

KARAKTERISASI GENETIK *Trichoderma* spp INDIGENUS RIZOSFIR PISANG YANG BERPOTENSI PENGENDALIAN *Fusarium oxysporum* f. *Sp. cubense* PENYEBAB PENYAKIT LAYU FUSARIUM PADA PISANG

Nurbailis dan Martinus ^{*)}

ABSTRACT

The objective of the research was to characterize the genetic variation of Trichoderma spp. Study of genetic characters used Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain-reaction (RAPD-PCR) that amplicated with four primers (OPA 2, OPA 17, OPB- 05 and Primer 2). Analysis result of genetic variation of Trichoderma spp make as dendrogram. The result of the research indicated that : 1) Trichoderma spp. had the great genetic variation, 2)Trichoderma isolate from the same region did not always have the same genetic profile, 3) S6 and T1 isolates were effective to inhibit the growth of Fusarium oxysporum f. Sp. cubense than the others but had a different genetic profile.

Keywords : *Trichoderma* spp, *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense, karakterisasi genetik

^{*)} Jurusan Hama dan Penyakit Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang, email: firmanmhd@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit penting yang menyebabkan kerugian yang paling besar pada tanaman pisang adalah penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh jamur tular tanah *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp.cubense (*Foc*) (Pegg and Langdon, 1987). Penyakit ini tergolong sulit dikendalikan karena: 1. *Foc* dapat membentuk kladidospora yang merupakan struktur bertahan jika tidak ada tanaman inangnya, 2. *Foc* dapat menyerang semua stadia pertumbuhan tanaman, 3. *Foc* mempunyai 4 ras fisiologis yaitu ras 1, 2, 3 dan 4 dengan tingkat virulensi yang berbeda (Pegg *et al*, 1996; Bently *et al* 1998).

Salah satu alternatif pengendalian yang mempunyai harapan untuk dikembangkan adalah penggunaan agensia hayati seperti *Trichoderma* spp. Keberhasilan *Trichoderma* untuk pengendalian patogen tular tanah telah banyak dilaporkan. Papavizas dan Lewis (1989) menyatakan bahwa beberapa isolat *T.harzianum* mampu menekan serangan penyakit rebah kecambah 30 – 50% pada tanaman buncis yang disebabkan oleh *Sclerotium rolfsii*.

Mekanisme *Trichoderma* spp dalam mengendalikan berbagai jenis patogen tanaman dapat dibedakan secara langsung dan tidak langsung terhadap patogen. Mekanisme secara

langsung berupa: kompetisi, mikoparasit, antibiosis dan lisis (Howell, 2003). Mekanisme tidak langsung terhadap patogen adalah: memperkuat sistem perakaran, meningkatkan pertumbuhan tanaman, meningkatkan ketersediaan hara, menonaktifkan enzim patogen dan merangsang perkecambahan benih (Harman,2000).

Trichoderma mempunyai habitat yang tersebar luas pada berbagai jenis tanah, lahan pertanian dan substrat organik. Jamur ini terdiri dari berbagai spesies dan strain dengan karakter yang berbeda-beda (Watanabe, 2002; Rifai, 1969). Beberapa hasil penelitian terdahulu membuktikan bahwa isolat-isolat *Trichoderma* mempunyai kemampuan yang berbeda-beda dalam menekan pertumbuhan jamur patogen (Nagamani dan Mew, 1987; Nurbailis *et al*, 2005).

Nagamani dan Mew (1987) melaporkan bahwa hasil isolasi *Trichoderma* dari 23 Propinsi di Filipina ternyata memiliki tingkat mikoparasitisme yang berbeda-beda terhadap *R. solani* penyebab hawar pelepah pada padi. Hasil penelitian Nurbailis *et al* (2005) juga menunjukkan bahwa isolat-isolat *Trichoderma* yang diisolasi dari beberapa sentra produksi pisang di Sumatera Barat memperlihatkan kemampuan yang berbeda dalam menekan pertumbuhan *Foc* secara in vitro dan in planta.

Perbedaan kemampuan isolat *Trichoderma*

dalam menekan pertumbuhan *Foc* disebabkan adanya perbedaan keragaman karakter genetik masing-masing isolat. Keragaman genetik yang tinggi dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi gen, reproduksi seksual dan paraseksual, faktor seleksi, dan migrasi gen dari suatu tempat ke tempat lain (Donald 1997). Hasil penelitian Goes *et al* (2002) menunjukkan bahwa kemampuan isolat *Trichoderma* dalam menekan pertumbuhan *R. solani* berbeda dan hasil analisis keragaman genetik antar isolat dengan menggunakan penanda RAPD menunjukkan bahwa isolat *Trichoderma* yang memiliki kemampuan antagonisme yang baik terdapat dalam kelompok genetik yang sama dengan tingkat kesamaan genetik 40%.

Dalam hal ini informasi dasar tentang karakter genetik isolat *Trichoderma* spp yang telah diuji yang berpotensi menekan pertumbuhan *Foc* belum diketahui. Berdasarkan permasalahan tersebut telah dilakukan penelitian lanjut tentang kajian karakter genetik dari isolat *Trichoderma* spp. dalam kaitannya terhadap kemampuan isolat dalam menekan perkembangan patogen.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengkarakterisasi secara genetik isolat *Trichoderma* spp indigenus rizosfir pisang yang berpotensi menekan pertumbuhan *Foc* penyebab penyakit layu Fusarium pada pisang.

METODA PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Fitopatologi jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian UNAND dan di laboratorium Biotek Perkebunan Bogor. Kajian karakter genetik isolat *Trichoderma* spp. dengan menggunakan penanda RAPD.

Kajian keragaman genetik berbagai isolat *Trichoderma*

Untuk mengetahui keragaman genetik antar isolat *Trichoderma* dilakukan dengan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain reaction* (RAPD-PCR).

Perbanyakan Isolat

Isolat *Trichoderma* spp ditumbuhkan pada media Potato Dextrosa Agar (PDA) dan diinkubasikan selama 7 hari pada suhu ruang.

Perbanyakan miselium untuk ekstraksi DNA

Konidia dipanen dari biakan jamur yang telah berumur 7 hari dan dimasukkan ke dalam

labu Erlenmeyer yang berisi 100 ml media cair 2% Malt extract Broth (MEB) dan diinkubasikan selama 4 hari pada *rotary shaker* dengan kecepatan 180 rpm pada suhu ruang. Miselia dipanen dengan cara disaring menggunakan kertas Whatman No.1 dan dicuci dua kali dengan air suling steril.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dari miselia *Trichoderma* spp menggunakan metode yang dikemukakan oleh Castle *et al.* (1998) cit Trizelia (2005) Miselia jamur sebanyak 50 µg digerus dalam nitrogen cair dengan menggunakan mortar. Serbuk miselium dipindahkan ke dalam tabung ependorf dan diberi 500 µl bufer ekstraksi (10mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), SDS-protease (0.5 mg/ml)). Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-40 menit sambil sesekali digoyang. Kemudian ditambahkan 1 volume campuran fenol : khloroform : isoamil alkohol (25:24:1) dan divorteks. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 11.000 rpm selama 15 menit. Fase cair yang terpisah diambil dan dipindahkan ke tabung ependorf baru, kemudian ditambahkan 0.25 volume 7.5M amonium asetat dan disentrifugasi pada kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung ependorf yang baru dan ditambahkan ke dalamnya 1 volume isopropanol dingin dan dikocok perlahan. Larutan disentrifugasi pada 11.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang ada dibuang dan pelet yang didapatkan dicuci dengan etanol 70% dan etanol dibuang dan pelet DNA dikeringkan dengan vakum. Pelet DNA dilarutkan dalam 100 µl TE lalu disimpan pada suhu -20°C.

Amplifikasi DNA dengan Teknik RAPD-PCR

Hasil ekstraksi DNA diamplifikasi dengan teknik RAPD-PCR menggunakan 4 macam primer dengan urutan basa (Tabel 1).

Tabel 1. Urutan Basa Primer untuk Amplikasi DNA *Trichoderma* spp

Primer	Urutan basa (5'---3')
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-17	GACCGCTTGT
OPB- 05	TGCGCCCTTC
Primer 2	GTTTCGCTCC

Volume final campuran reaksi PCR adalah

25 µl. Komposisi reaksi PCR sebagai berikut : 1 kali PCR buffer (10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, pH 8.8), 0.1 mM tiap d NTP, 3 mM MgCl₂, 0.4 µM primer, 1 unit *Taq* DNA polimerase (New England BioLabs Inc.), 20-25 ng DNA sampel dan ditambahkan air sehingga volume mencapai 25 µl. Amplifikasi DNA dengan menggunakan mesin PCR berlangsung dengan urutan sebagai berikut: Tahap 1: pra-amplifikasi PCR selama 5 menit pada suhu 92°C; Tahap II: amplifikasi PCR dilakukan sebanyak 40 siklus reaksi, dengan pemisahan utas DNA genom (denaturasi) pada suhu 92°C selama 1 menit. Penempelan primer (*annealing*) pada suhu 39°C selama 30 detik; sintesis pada suhu 72°C selama 2 menit; dan tahap III: Pasca amplifikasi pada suhu 72°C selama 5 menit.

Analisis DNA pada Agarose gel electrophoresis

Fragmen DNA hasil amplifikasi untuk setiap primer diambil sebanyak 8 µl dan ditambah dengan 2 µl larutan penanda (0,25% *Bromophenol Blue* dan 40% (w/v) Sukrosa) kemudian dipisahkan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1.5% dengan menggunakan buffer TBE 1X dan dilanjutkan dengan pewarnaan melalui perendaman gel agarosa dalam larutan etidium bromida 0.5 µg/ml selama 30 menit dan dibilas dengan H₂O selama 30 menit. Pita DNA hasil amplifikasi diamati di atas transiluminator UV dan dilanjutkan dengan pemotretan menggunakan alat Gel UV dokumentasi.

Analisis Data Hasil RAPD

Pita polimorfik masing-masing sampel DNA diamati untuk menentukan adanya perbedaan isolat. Setiap posisi pita DNA diubah ke dalam bentuk data biner dengan memberi nilai 1 jika ada pita dan 0 jika tidak ada pita. Data biner ini selanjutnya diolah dengan menggunakan program komputer *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSys) versi 2.02. Berdasarkan nilai kesamaan genetik tersebut dilakukan analisis pengelompokan (*cluster analysis*) menggunakan metode *unweight pair group method average* (UPGMA). Hasil analisis pengelompokan tersebut berupa dendrogram kesamaan genetik yang menunjukkan hubungan kesamaan antar isolat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Amplifikasi DNA *Trichoderma* spp dengan OPA-02 dan OPA-05

Hasil amplifikasi DNA *Trichoderma* spp dengan primer OPA-02 dan OPA-05 dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari Gambar 1 Profil pita DNA 15 isolat *Trichoderma* spp. amplifikasi dengan PCR menggunakan primer OPA-02 (A) dan OPA-05 (B), M: Marker 1 kb DNA ladder. P1, P4, P6, P7: isolat yang berasal dari kabupaten Padang Pariaman, T1, T3, T4, T9, T11, T12: isolat yang berasal dari kabupaten Tanah Datar, S2, S6, S9, S10, S11: isolat yang berasal dari kabupaten Solo, dapat dilihat perbedaan jumlah pita yang dihasilkan oleh kedua primer, primer OPA-02 menghasilkan pita lebih banyak dibanding dengan primer OPA-05.

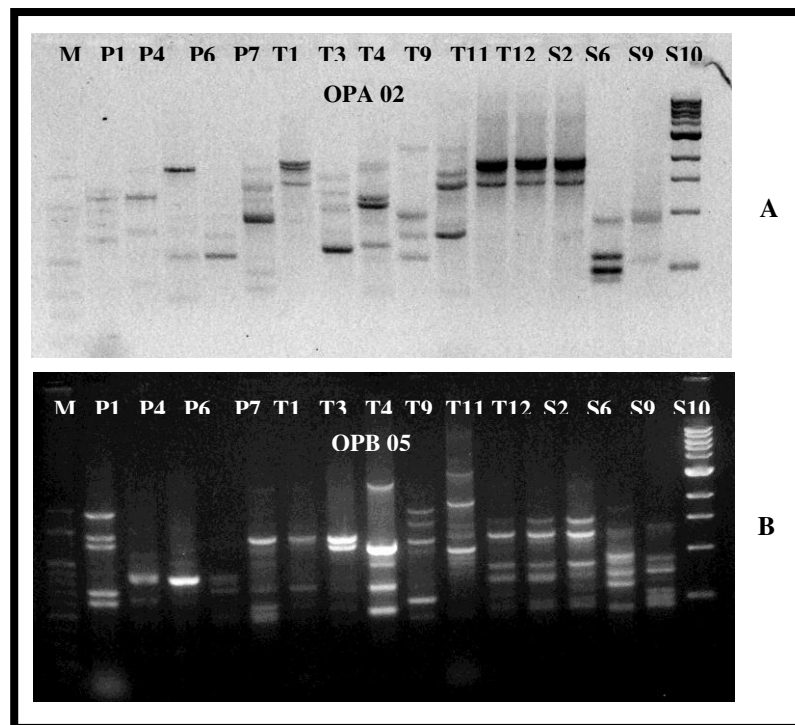
Analisis Data Hasil RAPD

Hasil analisis keragaman genetik dari 15 isolat *Trichoderma* spp berdasarkan Amplifikasi PCR menggunakan primer OPA-02 dapat dilihat pada dendrogram (Gambar 2).

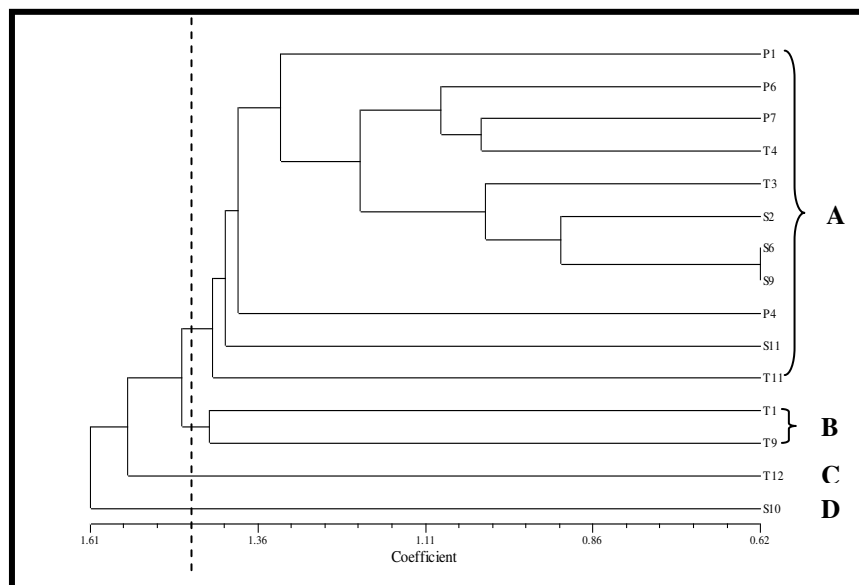
PEMBAHASAN

Hasil analisis keragaman genetik dari 15 isolat *Trichoderma* spp berdasarkan Amplifikasi PCR menggunakan primer OPA-02 dapat dilihat pada dendrogram (Gambar 2). Bila dendrogram ini dipotong pada koefisien 1,45%, maka lima belas isolat ini terpisah menjadi 4 kelompok yang terdiri dari 14 genotip. Hal ini menunjukkan bahwa ada keragaman genetik yang tinggi dari isolat *Trichoderma* spp. Tingginya keragaman genetik isolat *Trichoderma* spp disebabkan perbedaan daerah dan hamparan pengambilan sampel. Menurut Donald (1997), keragaman genetik yang tinggi dari suatu populasi dapat terjadi karena adanya mutasi, rekombinasi gen, reproduksi seksual dan paraseksual, faktor seleksi, dan migrasi gen dari suatu tempat ketempat lain.

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa pada tingkat kesamaan genetik 1,45%, 15 isolat *Trichoderma* spp membentuk 4 kelompok. Kelompok A terdiri dari isolat P1, P6, P7, T4, T3, S2, S6, S9, P4, S11, dan T11. Kelompok B terdiri dari isolat T1 dan T9. Kelompok C terdiri dari isolat T12 dan kelompok D terdiri dari isolat S10.



Gambar 1. Profil Pita DNA 15 isolat *Trichoderma* spp. Amplifikasi dengan PCR Menggunakan Primer OPA-02 (A) dan OPA-05 (B)



Gambar 2. Dendrogram Kesamaan Genetik 15 Isolat *Trichoderma* spp dengan Menggunakan Primer OPA-02.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

- Isolat *Trichoderma* spp yang diamplifikasi menggunakan PCR dengan primer OPA-02 dan OPA-05 memiliki keragaman genetik yang tinggi.
- Isolat yang berasal dari daerah yang sama tidak selalu memiliki profil genetik yang

sama.

- Isolat T1, S6 dan S10 merupakan isolat yang efektif menekan *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubence* namun tidak memiliki profil genetik yang sama.

Saran

Perlu dilakukan identifikasi sampai tingkat spesies terhadap semua isolat yang diuji

DAFTAR RUJUKAN

- Bently, S., Pegg, K. G., Moore, N. Y., Davis, R. D. and Buddenhagen, H, (1998), *Genetic variation among vegetative compatibility groups of Fusarium oxysporum f. sp. cubense analyzed by DNA fingerprinting*, **Phytopathology**. Vol. 88 : 1283-1292
- Goes L.B, da Costa ABL, Freire LLC, de Oliveira NT, (2002), *Randomly amplified polymorphic DNA of Trichoderma isolates and antagonism against Rhizoctonia solani*, **Brazilian Archives of Biology and Technology** 45(2):151-160.
- Harman, G.E, (2000), *Changes in Perceptions Derived from Research on Trichoderma harzianum T-22*, **Plant disease**/April 2000, Publication No. D-2000-0208-01F.
- Howell C. R., (2003), **Mechanism employed by Trichoderma spesies in the Biological control of plant disease : The history and evolution of current concepts**. USDA/ARS Southern Plains Agricultural Research Center.
- McDonald B.A., (1997), *The population genetics of fungi: tools and techniques*. **Phytopathology** 87:448-453.
- Nagamani A & Mew T. W, (1987), **Trichoderma a potential biological control in the rice-based cropping System**. IRRI Seminar. 1987.
- Nurbailis, Mardinus, Natsir N, Dharma A dan Habazar T, (2006), *Penapisan Isolat Trichoderma yang bersal dari Rizosfir Tanaman pisang di Sumatera Barat untuk Pengendalian Penyakit Layu Fusarium*, **Jurnal Akta Agrosia** Vol. 9 (1) : 49 – 55.
- Papavizas, G.C. and Lewis JA, (1989), *Effect of Gliocladium and Trichoderma on damping off and blight of Snapbean caused by Sclerotium rolfsii in the green house*, **Plant Pathology** 38 : 277-286.
- Pegg, K.G. & Langdon PW, (1987), *Fusarium Wilt (Panama disease). A review In Banana and Plantain breeding Strategies (Eds.) Persley GJ and d.Langhe EA. Proceeding and Internasional Workshop Held at Cairns, Australia*, **ACIAR proceeding**, 21 ; 23 – 119
- Pegg, K. G., Moore, N. Y. and Bently, S., (1996), *Fusarium wilt of banana in Australia: a review*, **Australian Journal of Agricultural Research** 47 :637-650
- Rifai MA, (1969), *A revision of the genus Trichoderma*, **Mycol. Pap**. 116 : 56
- Trizelia, (2005), **Cendawan Entomopatogen Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes): Keragaman Genetik, Karakterisasi Fisiologi, dan Virulensinya terhadap Crocidolomia pavonana (F.) (Lepidoptera: Pyralidae)**, [Disertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Watanabe, T, (2002), **Pictorial Atlas of soil and seed fungi. Morphologies of culture fungi and key to spesies**, Second edition, CRC Press, Boca raton London New York Washington D.C.